

Využití effect-based metod k hodnocení stavu povrchových vod

MARTIN HORA, ALENA KRISTOVÁ, PŘEMYSL SOLDÁN

Klíčová slova: effect based metody – povrchové vody – ekotoxikologie

ABSTRAKT

Tento článek se zabývá využitím effect-based metod (EBM) ke kvalitativnímu hodnocení stavu povrchových vod v kontextu směrnice 2000/60/ES ustavující rámec pro činnost Společenství v oblasti vodní politiky a připravované novely směrnice 2008/105/ES, o normách environmentální kvality. Současně prováděný monitoring prioritních látek a specifických znečišťujících látek nezachytí veškeré zdroje znečištění, které mohou negativně ovlivňovat jakost povrchových vod. Stejně tak nynější praxe neumožňuje komplexní hodnocení směsí, včetně emergentních polutantů, metabolitů a transformačních produktů látek na kvalitu vod. Effect-based metody využitím ekotoxikologického hodnocení znečištění vod mohou zachytit celkový biologický vliv látek v tomto znečištění obsažených (včetně synergických účinků). Poskytují tak důležitou doplňující informaci k výsledkům hodnocení stavu útvarů povrchových vod.

ÚVOD

Rámcová směrnice o vodě 2000/60/EC vyžaduje od členských států Evropské unie (EU) integrovaný přístup k monitoringu a hodnocení kvality povrchových vod. V ČR monitoring probíhá v souladu s požadavkem Vyhlášky 98/2011 [1] ve znění §21 vodního zákona [2] a normami kvality životního prostředí v rámci celé EU. Současný monitoring chemického stavu vod však neumožňuje z technických a ekonomických důvodů analyzovat, detekovat a kvantifikovat všechny látky přítomné ve vodním prostředí [3, 4]. Je předně zaměřen na sledování vybraných regulovaných chemických látek – prioritních, prioritních nebezpečných a dalších látek znečišťujících, u nichž je známo, jaké nebezpečí pro vodní prostředí představují. Tyto informace však nevypovídají nic o jejich skutečných souhrnných účincích ve vodním prostředí. Do monitoringu je navíc nutné zahrnout i působení tzv. emergentních mikropolutantů. Mezi ně řadíme léčiva a kosmetické přípravky, biocidy, polární pesticidy, endokrinní disruptory, jejich metabolity a transformační produkty. Navíc, látky přítomné ve vodním prostředí vytvářejí směsi, jejichž výsledný účinek nelze na základě samotné chemické analýzy předvídat.

Hlavním cílem projektu „*Využití effect-based metod k hodnocení stavu povrchových vod v kontextu Rámcové směrnice o vodě*“ je vytvoření metodiky pro hodnocení znečištění vod pomocí effect-based metod (EBM), jejichž použití by bylo vhodné začlenit do Rámcové směrnice o vodě (Water Framework Directive, zkratka WFD) 2000/60/ES [5]. Tento typ monitoringu je užitečným ekotoxikologickým nástrojem pro hodnocení znečištění vod sloužícím jako screeningová metoda, dovolující cílené zaměření dalších druhů monitoringu a v

návaznosti na to nalezení původu znečištění a nastavení opatření ke zlepšení stavu vod. Touto problematikou se podrobně zabývají např. dokumenty US EPA [6–8]. Zároveň je nyní na úrovni členských států projednávána novela směrnice 2008/105/ES, která v článku 8a zavádí novou povinnost monitorovat po dobu dvou let přítomnost estrogenních látek ve vodních útvech pomocí EBM, kde budou v případě pozitivních nálezů konvenčními analytickými metodami monitorovány hormony: 7-beta-estradiol (E2), estron (E1) a alfa-etinyl-estradiol (EE2).

EBM jsou analytické metody využívající celkové odpovědi organismu (*in vivo*) nebo buněčné odpovědi (*in vitro*) k detekci a kvantifikaci působení různých skupin chemikálií a k určení relevantních toxikologických endpointů [4]. Začlenění těchto metod do současného monitoringu by tedy umožnilo hodnotit účinky komplexních směsí polutantů vyskytujících se v prostředí podle mechanismu jejich účinku [5, 7–9].

EBM mohou pomoci prioritizovat problematické skupiny látek, což je využitelné pro návrhy cílených opatření ke snížení jejich vnosu a ke zlepšení stavu vod. Dalším důležitým aspektem jejich použití je potenciál snížit zátěž spojenou s monitoringem stále rostoucího seznamu prioritních a znečišťujících látek. EBM jsou vhodné k propojení monitoringu chemického a ekologického stavu vodního prostředí a mohou napomoci ke stanovení příčin nevyhovujícího ekologického stavu vod a k identifikaci dalších látek, jež mohou být hrozbou pro vodní ekosystémy a lidské zdraví. Použití EBM umožňuje cenově efektivní analýzu rizik, kdy absence efektu implikuje absenci toxikologického rizika.

Použité metody byly vybrány s ohledem na pokrytí různých mechanismů účinku toxických látek na základě potřebné citlivosti. Podkladem byla technická zpráva EU [11] a další zdroje [10, 12]. S ohledem na malý objem vzorku po provedení nutné předúpravy byly zvoleny testy ekotoxicity na zástupcích dvou trofických vrstev vodních ekosystémů – na destruentech (bakterie *Aliivibrio fischeri*) a primárních producentech (zelené řasy *Raphidocelis subcapitata*). Mutagenita byla stanovována pomocí Amesova flukтуаčního testu [12, 14, 15]. V posledních letech se v souvislosti s kvalitou vod pozornost zaměřuje na estrogény a látky s estrogením účinkem. Ke stanovení hladiny estrogenů a látek s estrogením účinkem, která je na úrovni EU doporučována k monitoringu [12], byl použit YES test (yeast estrogen screen) [16, 17].

METODIKA

Výběr profilů a plán vzorkování

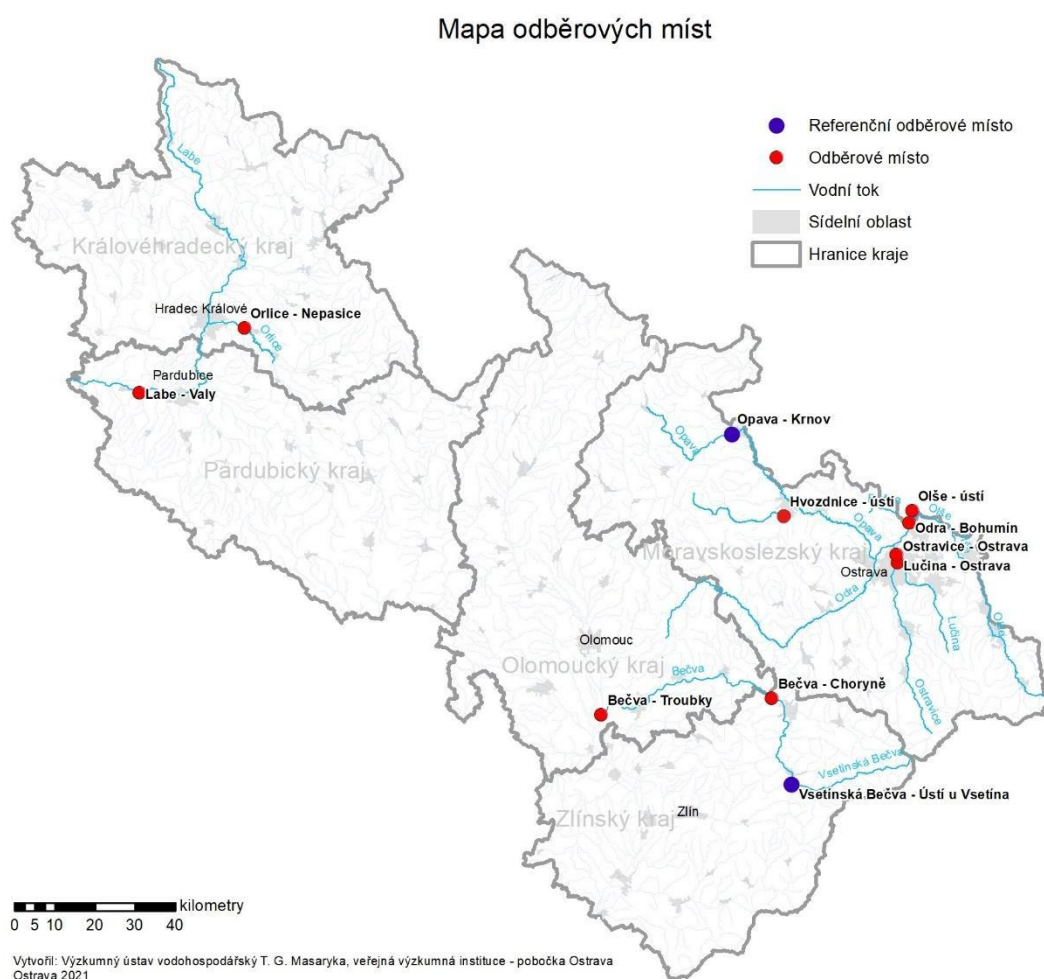
K hodnocení stavu povrchových vod pomocí EBM bylo na základě dat ČHMÚ a konzultací se státními podniky Povodí vytipováno 11 lokalit ve třech povodích (povodí Odry, Moravy a Labe). Devět lokalit vykazuje dlouhodobě špatnou jakost vod, která je ve většině případů způsobena nadlimitními koncentracemi fosforu a dusíku, ale i zvýšeným výskytem některých prioritních a dalších znečišťujících látek a kovů (dle Nařízení vlády č. 401/2015 Sb. [17]). Dvě lokality byly vybrány jako referenční s udávanou dlouhodobě dobrou jakostí vod. Zvolené profily jsou uvedeny v tab. 1, mapa lokalit je znázorněna na obr. 1.

Tab. 1. Přehled profilů

Tab. 1. Water profiles overview

Povodí Odry	Povodí Moravy	Povodí Labe
CHMI_3585 Hvozdnice – ústí	CHMI_3670 Bečva – Troubky	CHMI_0101 Labe – Valy
CHMI_1154 Lučina – Slezská Ostrava	CHMI_1171 Bečva – Choryně	CHMI_1026 Orlice – Nepasice
CHMI_1163 Odra – Bohumín	BPPVB009 Vsetínská Bečva – ústí *	
CHMI_3791 Olše – ústí		
CHMI_1152 Ostravice – Ostrava		
CHMI_1141 Opava – Krnov*		

*Referenční profily s dobrou jakostí vod



Obr. 1. Mapa sledovaných lokalit

Fig. 1. Map of monitored locations

V roce 2021 a 2022 proběhlo celkem šest vzorkovacích kampaní (tab. 2).

Tab. 2. Přehled termínů odběrů na vybraných sledovaných profilech

Tab. 2. Overview of subscription dates on selected monitored profiles

Profil	Odběry 2021		
	1. kampaň	2. kampaň	3. kampaň
Hvozdnice – ústí	30. 06. 2021	31. 08. 2021	05. 10. 2021
Opava – Krnov	15. 07. 2021	19. 08. 2021	07. 10. 2021
Lučina – Slezská Ostrava	29. 07. 2021	31. 08. 2021	14. 10. 2021
Ostravice – Ostrava	01. 07. 2021	31. 08. 2021	14. 10. 2021
Olše – ústí	07. 07. 2021	04. 08. 2021	06. 10. 2021
Odra – Bohumín	07. 07. 2021	04. 08. 2021	06. 10. 2021
Bečva – Choryně	21. 07. 2021	24. 08. 2021	25. 10. 2021
Vsetínská Bečva – ústí	22. 07. 2021	25. 08. 2021	26. 10. 2021
Bečva – Troubky	21. 07. 2021	24. 08. 2021	25. 10. 2021
Orlice – Nepasice	29. 06. 2021	x	04. 10. 2021
Labe – Valy	29. 06. 2021	x	04. 10. 2021
Profil	Odběry 2022		
	1. kampaň	2. kampaň	3. kampaň
Hvozdnice – ústí	04. 04. 2022	27. 06. 2022	25. 10. 2022
Opava – Krnov	13. 04. 2022	18. 07. 2022	13. 10. 2022
Lučina – Slezská Ostrava	29. 03. 2022	29. 06. 2022	03. 10. 2022
Ostravice – Ostrava	29. 03. 2022	29. 06. 2022	03. 10. 2022
Olše – ústí	06. 04. 2022	13. 07. 2022	05. 10. 2022
Odra – Bohumín	06. 04. 2022	13. 07. 2022	05. 10. 2022
Bečva – Choryně	23. 03. 2022	26. 07. 2022	24. 10. 2022
Vsetínská Bečva – ústí	25. 04. 2022	25. 07. 2022	24. 10. 2022
Bečva – Troubky	25. 04. 2022	26. 07. 2022	24. 10. 2022
Orlice – Nepasice	05. 04. 2022	11. 07. 2022	04. 10. 2022
Labe – Valy	05. 04. 2022	08. 08. 2022*	04. 10. 2022

x vzorek nebyl odebrán

*Labe – Valy, znehodnocení červencového odběru vzorku 11. července 2022, odběr zopakován 8. srpna 2022

Použité metody

Předúprava vzorků

Předúprava vzorků spočívá v zakoncentrování znečištění v nich obsaženého. Tento postup je zvolen na základě předpokladu, že zvýšení koncentrace působících látek umožní modelovat jejich možný chronický účinek při výrazně kratší době expozice, tedy pomocí testů akutní toxicity (účinek je ovlivněn nepřímou závislostí koncentrace na době expozice).

Zakoncentrování odebraných vzorků bylo provedeno dle TNV 75 7231 [18]. K 20 litrům vzorku povrchové vody byly přidány XAD pryskyřice a vzorek promícháván po dobu 24 hodin. Poté byly adsorbované látky vymyty rozpouštědlem a převedeny do vodného 1 000x zakoncentrovaného vzorku. Ten byl následně použit pro hodnocení pomocí vybraných effect-based metod:

- Test toxicity s destruenty: Microtox test s luminiscenční bakterií *Aliivibrio fischeri* dle normy ČSN EN ISO 11348 [15].
- Test toxicity s producenty: miniaturizovaný test inhibice růstu zelených řas dle ČSN EN ISO 8692 [16].
- Endokrinní disrupce – hodnocení estrogenity pomocí komerčního kitu využívající kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (S-YESMD New Diagnostic).
- Genotoxicita – stanovení přímé mutagenity pomocí Amesova testu s bakteriální kulturou *Salmonella typhimurium* (kmeny TA 98 a TA 100) dle ISO 11350:2012 [21].

Při provádění testů byla v některých případech zaznamenána zvýšená toxicita slepých vzorků. Protože byl vyloučen vliv rozpouštědla, předpokládali jsme vliv zbytkové toxicity po kondicionaci polymerních pryskyřic (XAD rezinů). XAD reziny jsou komerčně dodávány a uchovávány v nádobách vlhké s přidavkem chloridu sodného a uhličitanu sodného, aby bylo zabráněno nežádoucímu mikrobiálnímu nárůstu. Kromě toho, mohou být na reziny z procesu výroby nasorbovány další nežádoucí látky, které mohou negativně ovlivnit výsledky samotných testů ekotoxicity. Původní postup pročištění methanolem a následný oplach demineralizovanou vodou byl na základě dat získaných rešerší upraven. Reziny byly pročišťovány a kondicionovány v soxhletových extraktorech po dobu 8 hodin methanolem a následně 8 hodin acetonem [22]. Jde totiž o rozpouštědla, která jsou v dalších krocích testování používána i při samotné extrakci sorbovaných látek a jsou také doporučována výrobcí XAD rezinů (např. Supelco, Sigma Aldrich).

Kromě změny kondicionace XAD pryskyřic byla provedena i změna oproti TNV 75 7231 v provedení extrakce. Zmíněná norma doporučuje k extrakci aceton. Jako druhé činidlo byl přidán methanol, který je polárnějším rozpouštědlem ve srovnání s acetonem a je vhodný např. k extrakci široké řady pesticidů a farmak, kdy by mělo dojít k rozšíření extrahovaných látek o zmíněné látky s vyšší polaritou. Změny v extrakčních postupech zahrnovaly promíchávání rezinů se sorbovanými látkami v koloně po dobu 30 minut s methanolem. Methanolvý extrakt byl z kolon slit do předpřipravených nádob. Poté byl k rezinům do kolon přidán postupně, ve dvou následujících krocích, na dobu dvakrát 15 minut aceton. První acetonový extrakt obsahoval i malé množství methanolu z prvního kroku extrakce, proto byly po 15 minutách sorbované látky na rezinech extrahovány opětovně čistým acetonem. Spojením dvou acetonových extraktů byl vytvořen výsledný acetonový extrakt.

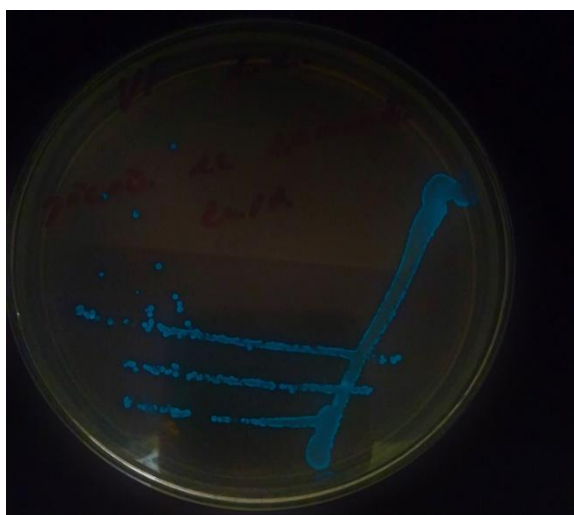
Takto vzniklé methanolvé a acetonové extrakty byly nejprve zahuštěny do objemu 5 ml na vakuové rotační odparce Heidolph (při teplotě vodní lázně 50 °C, při tlaku 300 mbar pro methanolvý extrakt a 550 mbar pro acetonový extrakt) [22–25]. Do konečného objemu 100 µl byly extrakty dofoukány dusíkem. Zahuštěný acetonový i methanolvý extrakt byl doplněn do objemu 10 ml demineralizovanou vodou. V posledním kroku byly tyto vzorky smíchány dohromady a vznikl 1 000x zakoncentrovaný vodný vzorek o objemu 20 ml určený pro effect-based analýzy.

Stanovení estrogenů

Stanovení vybraných estrogenů (E2 – 17 β -estradiol, EE2 – 17 α -ethinylestradiol, E1 – estron) metodou LC/MS bylo provedeno u 15 vybraných vzorků zakoncentrovaných povrchových vod z roku 2021 na kapalinovém chromatografu v laboratořích pražského oddělení hydrochemie VÚV TGM.

Test toxicity – luminiscenční test s *A. fischeri*

Stanovení inhibičního účinku vzorků na světelnou emisi mořských luminiscenčních bakterií *Aliivibrio fischeri* bylo provedeno dle normy ČSN EN ISO 11348-2. Jde o mořské aerobní, heterotrofní, gram-negativní bakterie schopné bioluminiscence. Emitace světla vzniká katalytickými účinky enzymu luciferázy na nízkomolekulární substrát luciferin. Vlivem toxických látek obsažených v testovaném vzorku dochází ke snížení luminiscence emitované těmito bakteriemi. Tato snížená hodnota je zaznamenávána a porovnána s kontrolou (obr. 2 a 3). Výsledky analýz bioluminiscenčního testu jsou obsaženy v tab. 2 v hodnotách EC₅₀ (ml/l). Tyto hodnoty vyjadřují koncentraci, u níž došlo k 50% poklesu luminiscence oproti kontrole.



Obr. 2. Ilustrativní fotografie luminiscenčních bakterií *A. fischeri* kultivované na Petriho misce

Fig. 2. Illustrative photos of luminescent bacteria *A. fischeri* cultured on a Petri dish

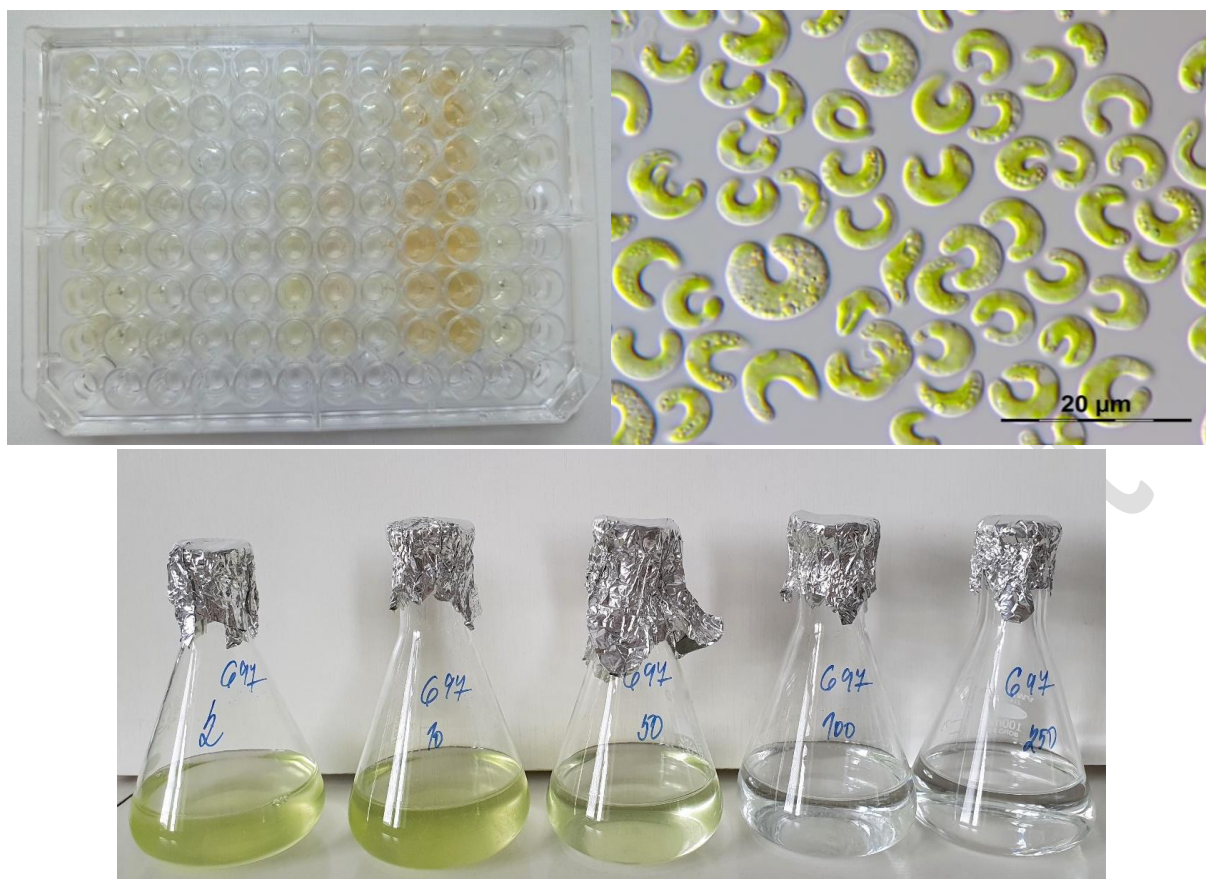


Obr. 3. Průběh měření změn intenzity luminiscence během testu

Fig. 3. The course of measurement of luminescence intensity changes during the test

Test toxicity – miniaturizovaný řasový test s *R. subcapitata*

Test inhibice růstu sladkovodních zelených řas vychází z normy ČSN EN ISO 8692 (obr. 4). Z důvodu omezeného množství získaných zakonzentrovaných vzorků byla použita miniaturizovaná metoda řasového testu. Miniaturizovaná verze testu neprobíhá v Erlenmeyerových baňkách, ale na 96jamkových mikrotitračních destičkách. Základní roztoky a podmínky provedení testů zůstávají shodné s již zmíněnou normou. Podstata zkoušky spočívá v kultivaci řasové kultury *R. subcapitata* ve vzorcích s přidavkem živného média, nezbytného pro růst řas. Kultivace probíhá v testovací místnosti se stálou teplotou 22 °C, při intenzitě světla pohybující se nad 6 000 lx. Po uplynutí 72 h je porovnána specifická růstová rychlost zkoumaných vzorků s kontrolním vzorkem. Výsledné hodnoty analyzovaných vzorků jsou vyjádřeny v % inhibice (popř. stimulace) růstu řas ve srovnání s kontrolním vzorkem.

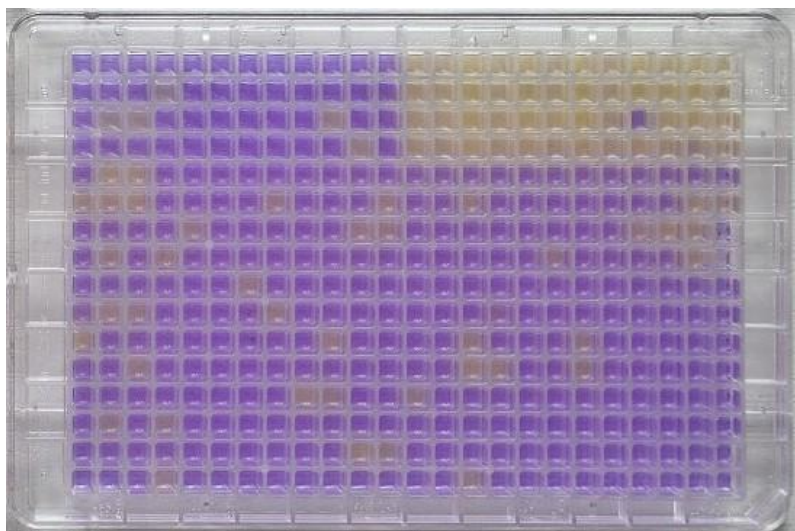


Obr. 4. Ukázka miniaturizovaného řasového testu (vlevo); mikrořasa *R. subcapitata* (vpravo);
dole standardní verze řasového testu probíhající v Erlenmeyerových baňkách
Fig. 4. Example of miniaturized algal test (left); Microalgae *R. subcapitata* (right); the
standard version of the algal test running in Erlenmeyer flasks below

Test genotoxicity – Amesův flukтуаční test

Amesův flukтуаční test (ISO 11350) byl použit pro detekci přítomnosti látek s mutagenním účinkem. Tento test prostřednictvím dvou geneticky modifikovaných bakteriálních kmenů *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotyp *Typhimurium* TA 98 a TA 100 sleduje výskyt přímých a nepřímých mutagenů ve vodném prostředí. Použitím obou zmíněných kmenů TA 98 a TA 100 je umožněno ve vzorcích detekovat látky, které indukují bodové mutace (substituce bází a posunové mutace) v genech kódujících enzymy, které se účastní biosyntézy aminokyseliny histidinu. Dvojnásobné zvýšení počtu revertant je považováno za signifikantní (obr. 5).

U Amesova testu bývá doporučováno i hodnocení cytotoxických účinků vzorků na bakteriální kmeny salmonel, založené na hodnocení růstové rychlosti bakteriálních kmenů v porovnání s kontrolními vzorky. Zjišťování cytotoxicity je doporučováno normou ISO 11350 pouze pro kmen salmonel TA 98. U kmene TA 100 může z důvodu nižší růstové rychlosti dojít ke zkreslení výsledků. V důsledku výrazného zabarvení některých analyzovaných vzorků, které zkreslovaly vyhodnocení cytotoxicity, bude potřeba provést optimalizaci vyhodnocení.



Obr. 5. Amesův flukтуаční test na mikrotitrační destičce

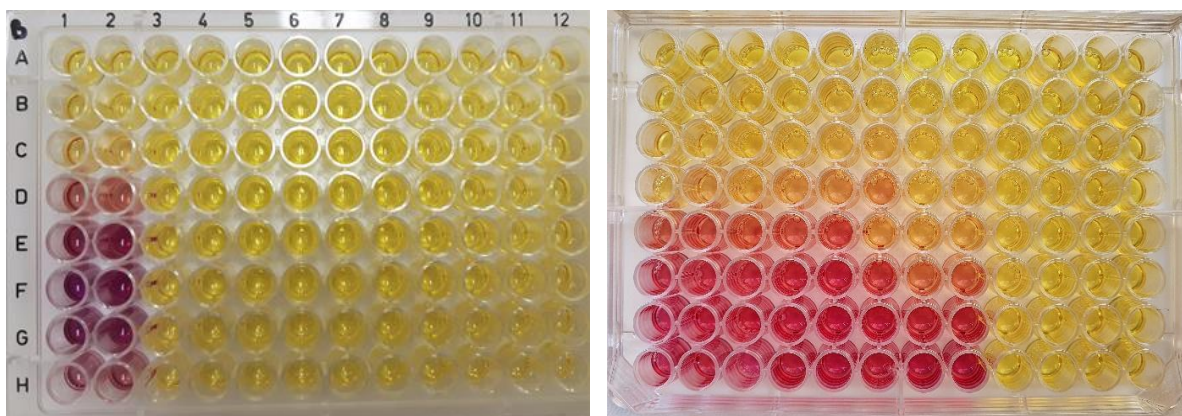
Fig. 5. Ames fluctuation test on a microtitre plate

Amesův test s metabolickou aktivací (S9⁺)

V roce 2022 bylo přistoupeno k otestování vzorků i ve variantě Amesova testu s metabolickou aktivací S9⁺, sledující nepřímé mutageny, které vyžadují metabolickou aktivaci jaterními enzymy, aby se projevil jejich mutagenní účinek. V této variantě testu byly testovány vzorky o koncentraci 500 ml/l.

Test na stanovení estrogenního potenciálu – Yeast estrogen test (YES test)

Metoda YES testu je zaměřena na stanovení estrogenního potenciálu vodných vzorků. Postup vychází z normy ISO 19040-1:2018 [26]. Tento kolorimetrický YES test využívá rekombinantních kvasinkových buněk *Saccharomyces cerevisiae* geneticky upravených tak, aby byly schopny exprese lidského estrogenního receptoru alfa (hER). V závislosti na přítomnosti estrogenních látek ve vzorku dochází ke změně barvy indikátoru (CPRG) tak, že se látka naváže na estrogenní receptor. Tím iniciuje expresi reportérového genu a syntézu β -galaktosidázy, která je buňkou uvolněna do média, v níž katalyzuje přeměnu žlutého substrátu CPRG na červený (obr. 6). Intenzita červené barvy souvisí s mírou estrogenní aktivity vzorku a vyhodnocuje se spektrofotometricky při OD₅₇₀ nm. Naměřená optická hustota (OD) přímo koreluje s množstvím vyloučené β -galaktosidázy, a tudíž aktivity testované látky, která se navázala na receptor.



Obr. 6. YES test

Fig. 6. YES test

VÝSLEDKY

Stanovení estrogenů

Měření probíhalo na vzorcích odebraných během tří kampaní v roce 2021 ve zvolených profilech. Ve vzorcích se nepodařilo stanovit žádný z estrogenů, jejich hodnoty se pohybovaly pod mezí stanovitelnosti.

Test toxicity – luminiscenční test s *A. fischeri*

Z výsledků v tab. 3a a 3b je patrné, že nejnižší hodnoty EC_{50} byly v obou letech 2021 a 2022 zaznamenány během první vzorkovací kampaně, kdy se hodnoty EC_{50} pohybovaly v rozmezí 15–119 ml/l. Vzorky odebrané v 2. vzorkovací kampani měly rozptyl hodnot EC_{50} 40–378 ml/l, přičemž hodnoty v roce 2021 byly oproti roku 2022 mírně zvýšené. Ve 3. vzorkovací kampani se hodnoty EC_{50} pohybovaly od 43 až po 434 ml/l, přičemž hodnoty v roce 2021 byly oproti roku 2022 opět mírně zvýšené.

Obecně lze konstatovat, že téměř všechny vzorky během první vzorkovací kampaně měly větší vliv na inhibici luminiscence oproti vzorkům z druhé a třetí vzorkovací kampaně. Žádná ze zjištěných hodnot EC_{50} nebyla nižší než 10 ml/l, tj. než je hodnota poukazující na významnou toxicitu vzorků.

Zjištěné hodnoty EC_{50} se u vzorků z některých profilů v jednotlivých kampaních výrazně lišily. Např. hodnota EC_{50} vzorku z profilu Opava – Krnov v roce 2022 z první kampaně patřila mezi nejnižší s hodnotou EC_{50} 18 ml/l. Oproti tomu vzorky odebrané z tohoto profilu během letní a podzimní kampaně patřily mezi nejméně toxické. Naopak nejmenší rozptyl hodnot EC_{50} byl zjištěn u vzorků odebraných v roce 2022 na profilu Labe – Valy. Vzorky z tohoto profilu vykazovaly téměř totožné hodnoty EC_{50} ve všech třech kampaních.

Tab. 3a. Výsledky luminiscenčního testu s *A. fischeri*, hodnoty EC_{50} po 30 min v ml/l (rok 2021)

Tab. 3a. Results of the luminescent test with *A. fischeri*, EC_{50} values after 30 min in ml/l (2021)

Profil	EC ₅₀ ml/l		
	1. kampaň	2. kampaň	3. kampaň
Hvozdnice – ústí	25 CHT	115	125
Opava – Krnov	63 CHT	91	279
Lučina – Slezská Ostrava	119	59 CHT	88
Ostravice – Ostrava	23 CHT	84	119
Olše – ústí	51 CHT	40 CHT	60 CHT
Odra – Bohumín	59 CHT	48 CHT	86
Bečva – Choryně	40 CHT	108	306
Vsetínská Bečva – Ústí	55 CHT	378	434
Bečva – Troubky	42 CHT	263	344
Orlice – Nepasice	17 CHT	x	73
Labe – Valy	17 CHT	x	64

x vzorek nebyl odebrán

CHT – chronická toxicita

Tab. 3b. Výsledky luminiscenčního testu s A. fischeri, hodnoty EC₅₀ po 30 min v ml/l (rok 2022)

Tab. 3b. Results of the luminescent test with A. fischeri, EC₅₀ values after 30 min in ml/l (2022)

Profil	EC ₅₀ ml/l		
	1. kampaň	2. kampaň	3. kampaň
Hvozdnice – ústí	24 CHT	144	55 CHT
Opava – Krnov	18 CHT	160	224
Lučina – Slezská Ostrava	52 CHT	34 CHT	72
Ostravice – Ostrava	32 CHT	61 CHT	60 CHT
Olše – ústí	15 CHT	114	183
Odra – Bohumín	27 CHT	154	137
Bečva – Choryně	*	88	50 CHT
Vsetínská Bečva – Ústí	54 CHT	341	43 CHT
Bečva – Troubky	15 CHT	96	91
Orlice – Nepasice	64	82	162
Labe – Valy	65	71	70

* vzorek zpracován odlišně od ostatních vzorků (odlišný způsob kondicionace rezinů). Hodnota EC₅₀ zjištěna 200 ml/l.

CHT – chronická toxicita

Test toxicity – miniaturizovaný řasový test s *R. subcapitata*

V tab. 4a a 4b jsou patrné výsledky analyzovaných vzorků povrchových vod odebraných v letech 2021 a 2022. Je zřejmé, že 4násobné ředění (c 250 ml/l) vzorků v některých případech

působilo 100% inhibici růstu řas. S dalším ředěním toxicita postupně klesala. Při 100násobném zředění, tj. koncentraci 10 ml/l, vzorky působily toxicky jen výjimečně.

V první vzorkovací kampani roku 2021 vykazoval zvýšenou toxicitu vzorek v profilu Hvozdnice – ústí, ve druhé pak vzorek v profilu Odra – Bohumín. Ve třetí vzorkovací kampani nebyl zaznamenán významný toxický vliv žádného ze vzorků. Obdobně v první vzorkovací kampani roku 2022 vykazoval zvýšenou toxicitu ve výše uvedené koncentraci pouze vzorek z profilu Odra – Bohumín. Ve druhé vzorkovací kampani byla v této koncentraci zjištěna vysoká toxicita u vzorku z profilu Bečva – Troubky. Ve třetí vzorkovací kampani nebyl zaznamenán významný toxický vliv žádného ze vzorků. V letní a podzimní kampani také docházelo v některých zkoumaných vzorcích ke stimulaci růstu řas vlivem látek v nich obsažených.

Přestože se v některých koncentracích jeví účinek inhibice řas významný, je potřeba si uvědomit, že byly analyzovány 1 000x zkoncentrované vzorky povrchových vod. Tyto vzorky byly následně v testech ředěny, aby bylo možné zjistit, které koncentrace mají ještě významný inhibiční vliv na řasový růst a které naopak minimální.

Tab. 4a. Výsledky řasového testu s *R. subcapitata* vyjádřené v EC_{50} v ml/l (rok 2021)

Tab. 4a. Algae test results with *R. subcapitata*, EC_{50} in ml/l (2021)

Výsledky 2021 řasy			
profil	1. kampaň	2. kampaň	3. kampaň
	EC_{50} (ml/l)		
Hvozdnice – ústí	30,33 HU	50,1 HU	C_{500} 28,83 %
Opava – Krnov	C_{500} 24,68 %	204,3	C_{500} 43,25 %
Lučina – Slezská Ostrava	C_{500} 20,77 %	94,8	C_{500} 1,66 %
Ostravice – Ostrava	470,1	199,2	C_{500} 3,33 %
Olše – ústí	186,9	49,0 HU	306,9
Odra – Bohumín	132,1	26,5 HU	163,0
Bečva – Choryně	144,9	88,6	478,2
Vsetínská Bečva – ústí	C_{500} 36,48 %	C_{500} 14,77 %	C_{500} 11,59 %
Bečva – Troubky	113,6	469,2	C_{500} 19,53 %
Orlice – Nepasice	371,4	x	234,4
Labe – Valy	69,3	x	116,9

x vzorek nebyl odebrán

HU – herbicidní účinek

C_{500} – účinek při koncentrátu v množství 500 ml/l

Tab. 4b. Výsledky řasového testu s *R. subcapitata* vyjádřené v EC_{50} v ml/l (rok 2022)

Tab. 4b. Algae test results with *R. subcapitata*, EC_{50} in ml/l (2022)

Výsledky 2022 řasy			
profil	1. kampaň	2. kampaň	3. kampaň
	EC ₅₀ (ml/l)		
Hvozdnice – ústí	76,2	28,5 HU	101,8
Opava – Krnov	c ₅₀₀ 46,8 %	c ₅₀₀ 10,3 %	c ₅₀₀ 29,86 %
Lučina – Slezská Ostrava	108,1	54,3 HU	174,0
Ostravice – Ostrava	c ₅₀₀ 48,08 %	216,9	111,5
Olše – ústí	104,3	184,6	418,4
Odra – Bohumín	31,9 HU	123,7	322,4
Bečva – Choryně	c ₅₀₀ 11,6 %	235,4	192,8
Vsetínská Bečva – ústí	242,3	c ₅₀₀ 48,42 %	468,3
Bečva – Troubky	20,3 HU	57,6 HU	161,1
Orlice – Nepasice	c ₅₀₀ 33,35 %	443,2	c ₅₀₀ 26,53 %
Labe – Valy	157,8	116,6	107,7

HU – herbicidní účinek

Test genotoxicity – Amesův flukтуаční test s metabolickou aktivací (S9+) a bez metabolické aktivace (S9-)

V roce 2021 byly získány výsledky Amesova flukтуаčního testu ve variantě bez metabolické aktivace S9- (tab. 5), kdy byly sledovány pouze přímé mutagenní látky. V první kampani byly mutagenní látky detekovány na profilech Hvozdnice – ústí, Opava – Krnov, Lučina – Slezská Ostrava a Ostravice – Ostrava. V letní kampani pak v profilech Hvozdnice – ústí, Lučina – Slezská Ostrava, Ostravice – Ostrava, Olše – ústí a Odra – Bohumín. V podzimní kampani byly pozitivně testovány profily Hvozdnice – ústí, Olše – ústí a Labe – Valy.

Tab. 5. Výsledky Amesova flukтуаčního testu ve variantě bez metabolické aktivace S9-

Tab. 5. Results of the Ames fluctuation test in the variant without metabolic activation S9-

Profil	Ames test varianta S9-					
	1. kampaň		2. kampaň		3. kampaň	
	TA98	TA100	TA98	TA100	TA98	TA100
Hvozdnice – ústí	+	-	+	-	+	-
Opava – Krnov	+	+	-	-	-	-
Lučina – Slezská Ostrava	-	+	+	-	-	-
Ostravice – Ostrava	+	-	-	+	-	-
Olše – ústí	-	-	+	+	+	-
Odra – Bohumín	-	-	+	-	-	-
Bečva – Choryně	-	-	-	-	-	-
Vsetínská Bečva – ústí	-	-	-	-	-	-
Bečva – Troubky	-	-	-	-	-	-
Orlice – Nepasice	-	-	x	x	-	-
Labe – Valy	-	-	x	x	+	-

+ ve vzorcích došlo k signifikantnímu zvýšení počtu revertant) (2021)

– ve vzorcích nedošlo k signifikantnímu zvýšení počtu revertant (2021)

x vzorek nebyl odebrán

V tab. 6 je znázorněno porovnání výsledku Amesova fluktuačního testu ve variantě bez metabolické aktivace S9- a variantě s metabolickou aktivací S9+ ve vzorcích povrchových vod odebraných v roce 2022. Pokud ve variantě testu S9+ nebo S9- bylo alespoň u jednoho z kmenů salmonel zjištěno signifikantní zvýšení revertant vůči kontrole, je vzorek označen jako pozitivní na přítomnost mutagenních látek ve vzorku.

V jarní kampani byla detekována přítomnost přímých nebo nepřímých mutagenních látek ve vzorku odebraném v profilech Lučina – Slezská Ostrava, Bečva – Choryně a Labe – Valy. Vzorek z Labe byl pozitivní na přítomnost mutagenních látek i ve 2. kampani. V této kampani byla přítomnost mutagenních látek dále detekována ve vzorcích z profilu Odra – Bohumín, Bečva – Choryně a Bečva – Troubky. V třetí kampani vykazovaly pozitivitu vzorky z Olše, Odry, Bečvy i Orlice. V roce 2022 byly opakovaně přímé mutageny zjištěny ve vzorcích z profilů Labe – Valy, Odra – Bohumín, Bečva – Choryně a Bečva – Troubky.

Tab. 6. Porovnání výsledků Amesova fluktuačního testu ve variantě bez metabolické aktivace S9- a variantě s metabolickou aktivací Sd+

Tab. 6. Comparison of Ames fluctuation test results in the variant without metabolic activation S9- and the variant with metabolic activation S9+

Profil	Ames test varianta S9- i S9+					
	1. kampaň		2. kampaň		3. kampaň	
	S9-	S9+	S9-	S9+	S9-	S9+
Hvozdnice – ústí	-	-	-	-	-	-
Opava – Krnov	-	-	-	-	-	-
Lučina – Slezská Ostrava	+	-	-	-	-	-
Ostravice – Ostrava	-	-	-	-	-	-
Olše – ústí	-	-	-	-	+	+
Odra – Bohumín	-	-	+	-	+	-
Bečva – Choryně	-	+	+	-	-	-
Vsetínská Bečva – ústí	-	-	-	-	+	+
Bečva – Troubky	-	-	+	-	+	-
Orlice – Nepasice	-	-	-	-	+	-
Labe – Valy	+	+	+	+	-	-

+ ve vzorcích došlo k signifikantnímu zvýšení počtu revertant (2022)

– ve vzorcích nedošlo k signifikantnímu zvýšení počtu revertant (2022)

Test na stanovení estrogenního potenciálu – Yeast estrogen test (YES test)

U vzorků odebraných v letech 2021 a 2022 nebyl YES testem významně zaznamenán indukční poměr (IR) β -galaktosidázy $\geq$ IR₁₀ (kde IR₁₀ = 10 % (IR_{max} standardu – IR negativní kontroly)) (tab. 7a a 7b). YES testem nebyly prokázány výsledky svědčící o přítomnosti látek, které by způsobovaly expresi reportérového genu a následnou *produkci* β -galaktosidázy v takové míře, že by mohl být vzorek signifikantně označen za pozitivní na přítomnost estrogenů nebo látek s estrogenními účinky na hER receptor. U šesti vzorků v roce 2021 se hodnota IR pohybovala nad 6 % maximální indukce β -galaktosidázy (tab. 7a, zvýrazněno). V tab. 7b jsou výrazně označeny dvě hodnoty ve 3. kampani (vzorek z profilů Bečva – Troubky a Labe – Valy), u nichž se hodnota IR_{max} pohybovala nad 9 %. Pokud by byla hodnota těchto vzorků $\geq$ 10 %, šlo by již o vzorky s prokázaným agonistickým estrogenním efektem. Pro ověření získaných výsledků budou vzorky, u kterých hodnota maximální indukce β -galaktosidázy překračovala 6%, opětovně analyzovány YES testem.

Tab. 7a. Výsledky estrogenní aktivity vzorků v kvasinkových testech estrogenity (YES test) (rok 2021)

Tab. 7a. Results of estrogenic activity of samples in yeast estrogen tests (YES test) (2021)

Profil	% indukce IR _{max}		
	1. kampaň	2. kampaň	3. kampaň
Hvozdnice – ústí	*	< 4% max. indukce	8,2 % max. indukce
Opava – Krnov	< 4 % max. indukce	10,5 % indukce	< 4 % max. indukce
Lučina – Slezská Ostrava	< 4 % max. indukce	< 4 % max. indukce	< 4 % max. indukce
Ostravice – Ostrava	< 4 % max. indukce	*	< 4 % max. indukce
Olše – ústí	< 4 % max. indukce	10,9 % indukce	< 4 % max. indukce
Odra – Bohumín	*	*	< 4 % max. indukce
Bečva – Choryně	7,1 % max. indukce	10,7 % indukce	8,4 % max. indukce
Vsetínská Bečva – ústí	< 4 % max. indukce	< 4 % max. indukce	< 4 % max. indukce
Bečva – Troubky	< 4 % max. indukce	< 4 % max. indukce	< 4 % max. indukce
Orlice – Nepasice	< 4 % max. indukce	x	< 4 % max. indukce
Labe – Valy	< 4 % max. indukce	x	7 % max. indukce

*zaznamenána cytotoxicita vzorků

x vzorek nebyl odebrán

Tab. 7b. Výsledky estrogenní aktivity vzorků v kvasinkových testech estrogenity (YES test) (2022)

Tab. 7b. Results of estrogenic activity of samples in yeast estrogenity tests (YES test) (2022)

Profil	% indukce IR _{max}		
	1. kampaň	2. kampaň	3. kampaň

Hvozdnice – ústí	< 6 % max. indukce	< 6 % max. indukce	< 6 % max. indukce
Opava – Krnov	< 6 % max. indukce	< 6 % max. indukce	< 6 % max. indukce
Lučina – Slezská			
Ostrava	6,6 % max. indukce	*	< 6 % max. indukce
Ostravice –			
Ostrava	7,2 % max. indukce	*	< 6 % max. indukce
Olše – ústí	< 6 % max. indukce	< 6 % max. indukce	< 6 % max. indukce
Odra – Bohumín	< 6 % max. indukce	< 6 % max. indukce	6,2 % max. indukce
Bečva – Choryně	< 6 % max. indukce	< 6 % max. indukce	< 6 % max. indukce
Vsetínská Bečva –			
ústí	< 6 % max. indukce	< 6 % max. indukce	< 6 % max. indukce
Bečva – Troubky	< 6 % max. indukce	8,2 % max. indukce	9,0 % max. indukce
Orlice – Nepasice	< 6 % max. indukce	< 6 % max. indukce	< 6 % max. indukce
Labe – Valy	< 6 % max. indukce	< 6 % max. indukce	9,3 % max. indukce

*zaznamenána cytotoxicita vzorků

DISKUZE A ZÁVĚR

Naše měření ukázala, že i na referenčních profilech, u nichž rutinní monitoring vybraných parametrů, prováděný podniky Povodí, vykazoval dlouhodobě dobrou jakost vod, byly u vzorků z některých kampaní stanoveny chronické účinky znečištění či jejich genotoxicita. Tento fakt ukazuje, že rutinní monitoring zřejmě nezachytil látky nebo jejich směsi, jež dané účinky mohly způsobovat, a finanční prostředky vynaložené na jeho provádění tedy nepřinesly požadované výsledky pro hodnocení ekologického stavu vod, který je významně ovlivňován právě vlivem znečištění stanovovaným pomocí EBM. V situaci, kdy stále roste seznam prioritních a emergentních znečišťujících látek, jež mají být ve vodách sledovány, má EBM potenciál chemický monitoring účelově zaměřit, a tím i zefektivnit náklady spojené s touto činností.

Dle Rámcové směrnice o vodě se hodnocení chemického stavu a ekologického stavu/potenciálu povrchových vod provádí monitoringem prioritních látek a specifických znečišťujících látek definovaných na národní úrovni (v ČR dle Nařízení vlády 401/2015 Sb. a normy ČSN 75 7221). Nicméně tyto rizikové látky tvoří pouze zlomek celkové toxicity vod. Chemická analýza není schopna pokrýt všechny polutanty přítomné ve vodách, tudíž na environmentální dopad neregulovaných látek, stejně jako na účinky směsí, není brán zřetel.

Rámcová směrnice 2000/60/ES vyžaduje, aby členské státy stanovily pro každý vodní útvar environmentální cíle. Nebude-li tento cíl naplněn, musejí být identifikovány příčiny, aby mohla být přijata účinná opatření. K tomuto účelu je třeba mít vhodný systém diagnostiky, často však takový nástroj není dostupný. Většina biologických metod používaných dle Rámcové směrnice mnohdy nemusí adekvátně reagovat na přítomnost toxických látek a jejich směsí ve vodách ani na jiné typy stresorů. EBM mohou poskytovat celkovou informaci o ekotoxikologických účincích znečištění povrchových vod a pomoci tak při hodnocení možných příčin nevyhovujícího stavu vod.

Na základě námi získaných zkušeností a výsledků provedených zkoušek lze tedy konstatovat, že náš projekt prokázal použitelnost navržených EBM v rutinní praxi a plně podporuje jejich zavedení nejen u nás, ale i na evropské úrovni.

Poděkování

Tento příspěvek byl podpořen projektem Technologické agentury ČR SS03010140 „Využití effect-based metod k hodnocení stavu povrchových vod v kontextu Rámcové směrnice o vodě“.

Literatura

- [1] *Vyhláška č. 98/2011 Sb., o způsobu hodnocení stavu útvarů povrchových vod, způsobu hodnocení ekologického potenciálu silně ovlivněných a umělých útvarů povrchových vod a náležitostech programů zjišťování a hodnocení stavu povrchových vod, ve znění pozdějších předpisů.*
- [2] *Zákon č. 254/2001 Sb., O vodách a o změně některých zákonů (vodní zákon), ve znění pozdějších předpisů.*
- [3] BRACK, W. a kol. Effect-Based Methods Are Key. The European Collaborative Project SOLUTIONS Recommends Integrating Effect-Based Methods for Diagnosis and Monitoring of Water Quality. *Environmental Sciences Europe*. 2019. 31(1), s. 4–9. Dostupné z: doi: 10.1186/s12302-019-0192-2
- [4] BUSCH, W., SCHMIDT, S., KÜHNE, R., SCHULZE, T., KRAUSS, M., ALTENBURGER, R. Micropollutants in European Rivers: A Mode of Action Survey to Support the Development of Effect-Based Tools for Water Monitoring. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2016, 35(8), s. 1 887–1 899. Dostupné z: doi: 10.1002/etc.3460
- [5] European Union. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 Establishing a Framework for Community Action in the Field of Water Policy. *Official Journal of the European Union*. 2000, L327, s. 1–73.
- [6] US EPA. *Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations. Phase I. Toxicity Characterization Procedures*. Second Edition, United States Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, EPA/600/6-9/003, 1991, 87 s. Dostupné z:
<https://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/300011NY.TXT?ZyActionD=ZyDocument&Client=EPA&Index=1991+Thru+1994&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&Toc=&TocEntry=&QField=&QFieldYear=&QFieldMonth=&QFieldDay=&IntQFieldOp=0&ExtQFieldOp=0&XmlQuery=&File=D%3A%5Czyfiles%5CIndex%20Data%5C91thru94%5CTxt%5C00000001%5C300011NY.txt&User=ANONYMOUS&Password=anonymous&SortMethod=h%7C-&MaximumDocuments=1&FuzzyDegree=0&ImageQuality=r75g8/r75g8/x150y150g16/i425&Display=hpfr&DefSeekPage=x&SearchBack=ZyActionL&Back=ZyActionS&BackDesc=Results%20page&MaximumPages=1&ZyEntry=1&SeekPage=x&ZyPURL>
- [7] US EPA. *Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations, Phase II. Toxicity Characterization Procedures for Samples, Exhibiting Acute and Chronic Toxicity*. United States Environmental Protection Agency, Office of Research and Development,

- EPA/600/R-92/080, 1993, 71 s. Dostupné z: <https://www3.epa.gov/npdes/pubs/owm0343.pdf>
- [8] US EPA. *Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations. Phase III. Toxicity Confirmation Procedures for Samples, Exhibiting Acute and Chronic Toxicity*. United States Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, EPA/600/R-92/081, 1993, 32 s. Dostupné z: <https://www3.epa.gov/npdes/pubs/owm0341.pdf>
- [9] WENERSSON, S., MAGGI, C., CARERE, M. *Technical Report on Aquatic Effect-Based Monitoring Tools. Technical Report*. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2014. Dostupné z: doi: 10.2779/7260
- [10] DE BAAT, M. L., KRAAK, M. H. S., VAN DER OOST, R., DE VOOGT, P., VERDONSCHOT, P. F. M. Effect-Based Nationwide Surface Water Quality Assessment to Identify Ecotoxicological Risks. *Water Research*. 2019, 159, s. 434–443. Dostupné z: doi: 10.1016/j.watres.2019.05.040
- [11] WENERSSON, A. S. a kol. The European Technical Report on Aquatic Effect-Based Monitoring Tools under the Water Framework Directive. *Environmental Sciences Europe*. 2015, 27(1), 7, s. 1–11. Dostupné z: doi: 10.1186/s12302-015-0039-4
- [12] CONNON, R. E., GEIST, J., WERNER, I. Effect-Based Tools for Monitoring and Predicting the Ecotoxicological Effects of Chemicals in the Aquatic Environment. *Sensors* (Switzerland). 2012, 12(9), s. 12 741–12 771. Dostupné z: doi: 10.3390/s120912741
- [13] AMES, B. N., MCCAN, J., YAMASAKI, E. Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmocella/Mammalian-microsome Mutagenicity Test. *Mutation Research*. 1975, 31(6), s. 347–364. Dostupné z: doi: 10.1016/0165-1161(75)90046-1
- [14] REIFFERSCHIED, G., MAES, H. M., ALLNER, B., BADUROVA, J., BELKIN, S., BLUHM, K. International Round-Robin Study on the Ames Fluctuation Test. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2012, 53(3), s. 185–197. Dostupné z: doi: 10.1002/em.21677
- [15] KUNZ, P. Y. a kol. Effect-based tools for monitoring estrogenic mixtures: Evaluation of five in vitro bioassays. *Water Research*. 2017, 110, s. 378–388. Dostupné z: doi: 10.1016/j.watres.2016.10.062
- [16] LU, Y., LYU, X. M., XIAO, S. H., YANG, Y. Z., TANG, F. Mutagenic and Estrogenic Effects of Organic Compounds in Water Treated by Different Processes: A Pilot Study. *Biomedical Environmental Sciences*. 2015, 28(8), s. 571–581. Dostupné z: doi: 10.3967/bes2015.081.
- [17] *Nariadení vlády č. 401/2015 Sb., o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech.*
- [18] TNV 75 7231 (757231). *Jakost vod – Metoda stanovení toxického rizika povrchových vod.*

- [19] ČSN EN ISO 11348-2 (757734). *Jakost vod. Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi Vibrio fischeri (Zkouška na luminiscenčních bakteriích), Část 2: Metoda se sušenými bakteriemi*, květen 2009.
- [20] ČSN EN ISO 8692 (757740). *Kvalita vod – Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas*, srpen 2012.
- [21] ISO 11350. *Water Quality – Determination of the Genotoxicity of Water and Waste Water — Salmonella/Microsome Fluctuation Test (Ames Fluctuation Test)*, 2012.
- [22] KANNO, A., NISHI, I., KISHI, T., KAWAKAMI, T., TAKAHASHI, Y., ONODERA, S. Mutagenic Potentials of Amberlite XAD-2 Resin Extracts Obtained from River and Drinking Waters in the Northwest District of Chiba, Japan. *Journal of Toxicological Sciences*. 2010, 35(6), s. 817–826. Dostupné z: doi: 10.2131/jts.35.817
- [23] CHU, T. M., OSAWA, Y., REYNOSO, G. Simple Assay for Urinary Estrogens in Nonpregnancy. *Clinical Chemistry*. 1971, 17(5), s. 438–439. Dostupné z: doi: 10.1093/clinchem/17.5.438
- [24] WILCOX, P., WILLIAMSON, S. Mutagenic Activity of Concentrated Drinking Water Samples. *Environmental Health Perspectives*. 1986, 69, s. 141–149. Dostupné z: doi: 10.1289/ehp.8669141
- [25] UZUN, A., SOYLAK, M., ELÇİ, L. Preconcentration and Separation with Amberlite XAD-4 Resin; Determination of Cu, Fe, Pb, Ni, Cd and Bi at Trace Levels in Waste Water Samples by Flame Atomic Absorption Spectrometry. *Talanta*. 2001, 54(1), s. 197–202. Dostupné z: doi: 10.1016/S0039-9140(00)00669-X
- [26] ISO 19040-1. *Water quality — Determination of the estrogenic potential of water and waste water — Part 1: Yeast estrogen screen (Saccharomyces cerevisiae)*, 2018.

Autoři

Mgr. Martin Hora

martin.hora@vuv.cz

ORCID: 0009-0000-3376-1103

Ing. Alena Kristová

alena.kristova@vuv.cz

ORCID: 0000-0002-7247-1640

RNDr. Přemysl Soldán, Ph.D.

premysl.soldan@vuv.cz

ORCID: 000-002-8892-5117

Příspěvek prošel lektorským řízením.

DOI: 10.46555/VTEI.2023.09.005

USE OF EFFECT-BASED METHODS TO ASSESS SURFACE WATER STATUS

HORA, M.; KRISTOVÁ, A.; SOLDÁN, P.

T. G. Masaryk Water Research Institute, Ostrava

Keywords: Effect based methods – surface waters – ecotoxicology

This article deals with the use of effect-based methods for the qualitative assessment of the state of surface waters in the context of Directive 2000/60/EC establishing the framework for Community activity in the field of water policy and the upcoming amendment to Directive 2008/105/EC on environmental quality standards. The implemented monitoring of priority substances and specific pollutants is not able to capture all sources of pollution that negatively affect surface water quality. Likewise, current practice does not allow a comprehensive assessment of mixtures, including emergent pollutants, metabolites and transformation products of substances on water quality. Effect-based methods are a suitable tool for ecotoxicological evaluation of pollution, which takes into account all substances contained in the sample and possible effects of mixtures (synergistic effects). They thus provide important additional information to the results of the assessment of the state of surface water bodies.